

氏 名	藤 本 正 文 ふじ もと まさ ふみ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 243 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Benzodiazepine レセプターを介する peptido-aminobenzophenone の作用発現に関する研究

(主 査)  
論文調査委員 教授 富田謙吉 教授 高木博司 教授 山科郁男

### 論 文 内 容 の 要 旨

Benzodiazepine 類は抗不安効果の他、筋弛緩、鎮静、抗けいれん等、多様な薬理作用を有する向精神薬である。この薬物は既知の神経伝達物質のいずれのレセプターにも作用しないなど、その生化学的作用機序は長い間不明であったが、1977年、Squires と Braestrup, Möhler と Okada が benzodiazepine に対し高い特異性と親和力を持つレセプターの存在をラットの脳で発見して以来、レセプターを中心として、その作用機序の研究が進みつつある。著者にまず、最初に、benzodiazepine レセプターの性質を確認したのち、薬理作用発現との関係を検討し、このレセプターの意義を明らかにした。

ラット脳内の benzodiazepine レセプターの分布は均一ではなく、大脳皮質、海馬、小脳に多く、橋・延髄、線条体に少ない。しかし、親和力はどの領域もほぼ等しかった。前脳の粗シナプトゾーム画分に対する  $^3\text{H}$ -diazepam の特異的結合をしらべたところ、 $0^\circ$ における解離定数は  $3.0 \pm 0.2 \text{ nM}$ 、結合部位数は  $0.44 \pm 0.07 \text{ pmol/mg protein}$  であった。反応温度の上昇とともに親和力が落ちるのは、解離反応が促進するためと考えられる。このレセプター標品に対する  $^3\text{H}$ -diazepam の特異的結合を阻害する強さから、13種の benzodiazepine のレセプターに対する親和力を求め、いくつかの薬理作用における強さとの相関をしらべた。既に報告されているように、抗-pentylenetetrazol けいれん、筋弛緩、馴化作用と有意の相関を示したほか、chlorprothixene 催眠強化作用とも高い相関を示した。又、日本での臨床用量とも高い相関を示した。これらの結果から、benzodiazepine のほとんどの薬理効果が、このレセプターを介して発現することが示唆された。

peptido-aminobenzophenone (図-1) は Hirai らにより合成された新しいマイナートランクライザーで、従来 benzodiazepine の作用発現に必須とされていた diazepam 環を有さないにもかかわらず、強力な benzodiazepine 様の薬理活性を有している。著者は benzodiazepine レセプターに対するこの薬物の作用を検討し、作用発現に至る機序を明らかにした。

Peptido-aminobenzophenone は diazepam より強い薬理活性を有するものでも、benzodiazepine レセプターに対する親和力は diazepam の数百分の一しかなかった。しかし、あらかじめ脳の粗シナプトゾ

ームや肝ホモジネートと 37° でプレインキュベートしたものについて、レセプターに対する親和力をしらべると、高い親和性を示すものに変化していることが判った。この活性化は、温度依存性でかつ立体特異性を示すので、酵素反応の関与が予測された。

次に、この活性化が実際に *in vivo* で生じることを確認し、そしてその結果生じた化合物を分離同定することを目的として、最も薬理活性の強い 2-0-chlorobenzoyl-4-chloro-N-methyl-N'-glycylglycinamide (compd 1) を投与したラット脳内の代謝物の検討を行った。薬効の認められる投与 15 分後の脳の抽出液は、レセプターに強い親和性を示し、compd 1 自体は検出できなかった。この抽出液について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行ったところ、4つの活性に分離することができた。この活性化化合物は、それぞれの溶出速度、薄層クロマトグラフィーの  $R_f$  値、さらには、ガスクロマトグラフィー質量分析法によって、図-2 に示す 4つの benzodiazepine と同定された。

さらに、著者はこれら 4つの benzodiazepine のレセプターに対する強い親和力に着目し、ラジオレセプターアッセイ (RRA) による微量定量法を確立し、HPLC と RRA を組み合わせ、compd 1 を 10 mg/kg 投与したラット脳内の benzodiazepine 含量の経時変化をしらべた。その結果は、図-2 に示した代謝経路を予測させた。又、薬理作用は 4つの benzodiazepine の薬理活性の総和として発現すると考えられるが、作用発現には 37° における解離定数の数十倍もの脳内レベルが必要であることが示唆された。このことからレセプター部位で作用するのは脳内 benzodiazepine の一部であると考えられる。

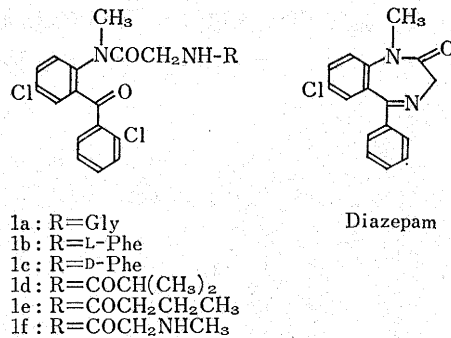


Fig. 1. Chemical Structure of Peptido-aminobenzophenones and Diazepam

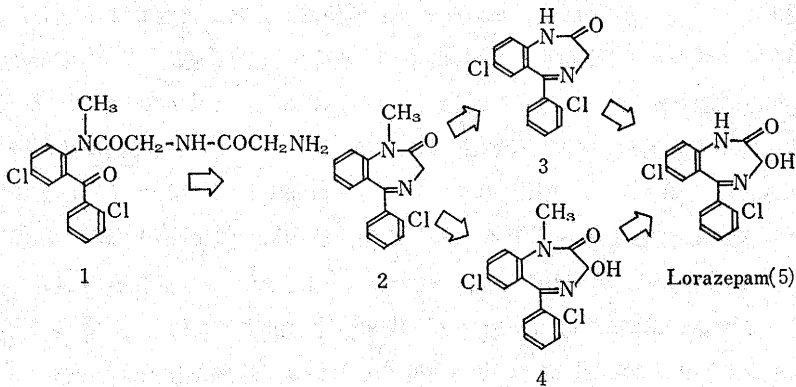


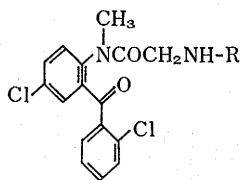
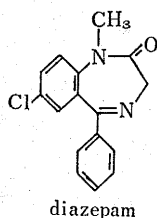
Fig. 2. Postulated Metabolic Pathways of Compd 1 in Rat

最後に著者は compd 1 の活性化の部位について検討した。In vitro における活性化能の強さは腎、小腸、肺、肝、脳、血液の順であった。次に、compd 1 を投与した時の各臓器の benzodiazepine レセプター親和性を調べたところ、小腸と肝では 8 分後に最高に達し、以後急速に減少するが血液では 15 分、脳では 30 分後が最高であった。さらに、小腸においてのみ、投与後 8 分まで compd 1 がわずかに残存しているものの、他の臓器にはほとんど認められず、このことは compd 1 が小腸から吸収される段階、もしくは吸収されたのち速やかに benzodiazepine に変化してしまうことを示唆するものである。

以上、著者は、脳に存在する benzodiazepine レセプターがこの薬物の作用点であることを確認し、新しいマイナートランキライザー peptido-aminobenzophenone それ自体はこのレセプターに弱い親和力しか持たないが、生体に投与された時、ほとんどが小腸で benzodiazepine に変化したのち、作用部位である脳に到達することを明らかにした。又、HPLC-RRA による微量定量法を確立し、その活性代謝物である 4 種の benzodiazepine の脳内経時変化をしらべ、peptido-aminobenzophenone が benzodiazepine のプロドラッグとして作用することを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

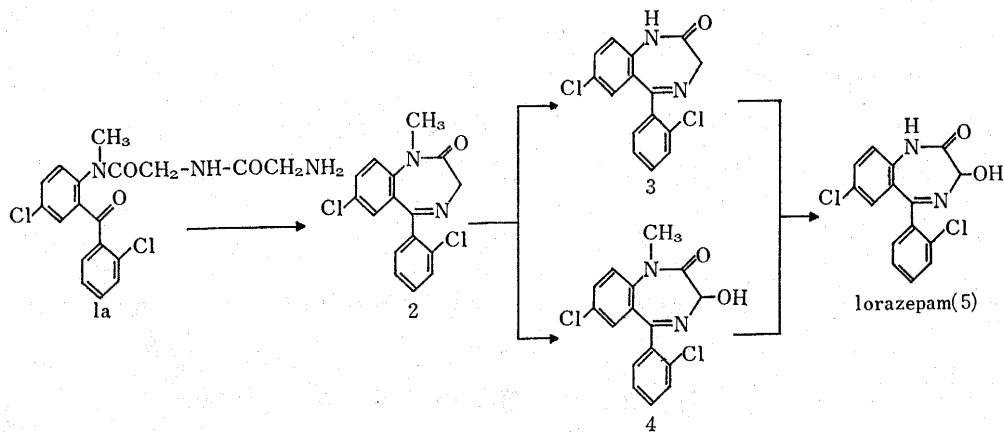
Benzodiazepine (BDZ) 誘導体 (例: diazepam) は抗不安作用を持つ向精神薬であるが、その副作用である運動失調や筋弛緩等の作用を除去する目的で BDZ 環を持たない抗不安薬の開発が望まれている。著者は強い BDZ 類似の薬理活性を持つ開環 BDZ 誘導体 peptido-aminobenzophenone (P-ABP) (1) の作用機序を脳の BDZ レセプターに対する親和性発現の面より検討して次の成果を得た。



- 1a: R=Gly
- 1b: R=L-Phe
- 1c: R=D-Phe
- 1d: R=COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- 1e: R=COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>
- 1f: R=COCH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>

(1) ラットの脳、橋・延髄を除いた全脳から調製した粗シナプトゾーム画分に対する <sup>3</sup>H-diazepam の特異的結合を検討し、この画分が BDZ レセプターとして使用し得ることをまず確立した。(2) 次に既存の 13 種の BDZ 誘導体のレセプター親和性 (<sup>3</sup>H-diazepam の特異的、可逆的結合の阻害活性として至適温度 4° で測定) と薬理活性との相関をしらべた結果、マウスの抗-pentyletetrazol けいれん作用、馴化作用、ネコの筋弛緩作用等と有意の相関を示し、レセプターが BDZ の多様な薬理活性発現と密接な関連を持つことを示唆された。(3) 一方、P-ABP のうち例えば compd 1a は diazepam より強い抗-pentyletetrazol けいれん作用を持ちながら、レセプター親和性は diazepam の 1/300 で薬理活性との相関は見られなかった。しかし著者は、P-ABP を脳シナプトゾームまたはラット肝臓のホモジェネートと 37° で予めインキュベートすると 4° におけるレセプター親和性を示すようになることを発現した。(4) 以上の in vitro での知見に基づき、compd 1a を腹腔内投与したラットの脳抽出液を検索したところ、BDZ レセプターに強い親和性を示す物質が存在するが、元の compd 1a は殆んど存在しないことが判明した。つ

いで、脳抽出液中の代謝産物の分離同定ならびに経時的变化を追跡を行い、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー・質量分析、ならびに新たに開発したラジオレセプターアッセイ等を併用して、compd 1a は次の経路で閉環、有効化されるものと推定した。



更に、1a 腹腔投与後のラット各組織中のレセプター親和活性を経時的に検討し、1a は脳に到達する前に小腸で速かに活性化されることも明らかにした。以上の成果は、BDZ 誘導体の作用機序をそのレセプター概念に基づいて明らかにしたもので、薬物の作用機序の解明に資するところが多い。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。